

生体過酸化脂質の超高感度網羅的分析法の開発に関する研究

著者	指宿 大悟
号	44
学位授与機関	Tohoku University
学位授与番号	農博第937号
URL	http://hdl.handle.net/10097/60263

氏 名(本籍)	いぶ 指	すき 宿	だい 大	ご 悟
学 位 の 種 類	博 士 (農 学)			
学 位 記 番 号	農 博 第 9 3 7 号			
学位授与年月日	平 成 20 年 3 月 25 日			
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当			
研 究 科 専 攻	農学研究科生物産業創成科学専攻 (博士課程)			
学 位 論 文 題 目	生体過酸化脂質の超高感度網羅的分析法の開発に関する 研究			
論文審査委員	(主 査)	教 授	宮 澤 陽 夫	
	(副 査)	教 授	桑 原 重 文	
		教 授	山 下 ま り	
		准教授	仲 川 清 隆	

論文内容要旨

第一章 序論

生体膜の主要構成成分は脂質、特にリン脂質である。脂質は酸化されやすい物質であるが、生体内では抗酸化酵素や抗酸化成分により脂質の酸化が抑えられている。しかし様々な要因により強い酸化ストレスが生じると、このバランスが崩れ、脂質の過酸化が進行する。例えば、老化により細胞の活動が低下すると、抗酸化酵素の減少、酸化障害を受けた細胞や組織を除去する機構の活性低下等により、酸化ストレスの影響を受けやすくなると考えられている。また、近年の生活習慣の変化、食の欧米化・生活リズムの乱れ・飲酒・喫煙・ストレスの増大等が社会問題となっているが、これらも体内の酸化ストレスを増加させる要因である。過酸化脂質の蓄積は、細胞障害のみならず、生活習慣病である動脈硬化・糖尿病や、認知症・癌などの様々な疾病の発症と進展の原因になると考えられている (Fig. 1)。

例えば、低密度リポタンパク (LDL) 粒子の膜脂質過酸化は、アテローム性動脈硬化症の原因と考えられている。LDL は血液循環系を通じて脂質、特にコレステロールを肝臓から組織へ輸送する担体であり、表面はリン脂質 (大部分がホスファチジルコリン, phosphatidylcholine, PC) の一重膜に覆われ、アポタンパク質 (Apo-B) が結合している。LDL の一部は、LDL の血中濃度上昇などにより血管壁内へ移行する。LDL リン脂質の構成脂肪酸はリノール酸 (linoleic acid) やアラキドン酸 (arachidonic acid) 等の不飽和脂肪酸が多く、酸化されやすい。LDL リン脂質は、血流中で血管内壁と接触、血管内壁の傷口に付着する等のストレスにより、リン脂質ヒドロパーオキシド、特にホスファチジルコリンヒドロパーオキシド (phosphatidylcholine hydroperoxide, PCOOH) を生じる。血管壁内に移行し膜リン脂質が過酸化された LDL (酸化 LDL, oxLDL) は、内膜内皮下層に遊走したマクロファージの食作用を受ける。酸化 LDL を過剰に取り込んだマクロファージは泡沫細胞となり、血管壁内に蓄積し、動脈硬化の初期段階である脂肪線条を形成して動脈壁の肥厚化、血管の狭窄化を起し、血流が阻害される。これにより血流が阻害され、脳血管疾患、心血管疾患等の原因となる。さらに病状が悪化すると、安定な病変組織である線維性プラークを形成する。プラークが損傷すると血栓を生じ、急性虚血性疾患を発症する。

従って、過酸化脂質、特に脂質過酸化反応 (Fig. 2) の第一次産物である脂質ヒドロパーオキシドを指標として、症状の進行程度、あるいは疾病に罹るリスクを評価できると期待される。脂質は種類や脂肪酸組成によって存在量、酸化されやすさ、二次生成物への分解・代謝速度が異なるため、脂質ヒドロパーオキシドを指標として用いるためには、体内の脂質ヒドロパーオキシドの分布を明らかにしなければならない。しかし生体の脂質ヒドロパーオキシドは検出定量が難しく、分子種別・脂肪酸組成別の脂質ヒドロパーオキシドの定量に成功した例は殆ど無い。この原因として、脂質ヒドロパーオキシドの信頼できる高純度標品が存在しなかったことが挙げられる。これまで用いられてきた脂質ヒドロパーオキシド標品は、酸化させた脂質をクロマトグラフィ等で粗精製したものが多く、純度は 80%程度だった。この程度の純度では、脂質ヒドロパーオキシドの分析に用いる標品としてだけでなく、脂質ハ

イドロパーオキシサドの生理作用を調べる培養細胞試験の試料としても不適である。さらに、生体内の脂質ハイドロパーオキシサドは多種類にわたり存在量も少ないため、既存の分析技術では感度および選択性の問題により測定が困難であったことも大きな原因である。

本研究では、ビニルエーテル型分子が酸性条件下でハイドロパーオキシサド基(-OOH)に付加する反応 (Fig. 3) を応用して、簡便かつ高収率な高純度脂質ハイドロパーオキシサド標品の調製法の確立を目指した(第二章)。また、LC-MS/MS を用い、PCOOH を構造別・網羅的に検出定量する方法を確立し(第二章)、健康者や高コレステロール血症者の血漿、血清の分析を行った(第四章)。

第二章 高純度脂質ハイドロパーオキシサドのビニルエーテル付加を用いた簡便かつ高収率な調製法の開発

脂質ハイドロパーオキシサド標品を高収率で調製するため、最適な反応条件の探索を行った。主要なリン脂質であるホスファチジルコリン (PC 16:0/18:2)、ホスファチジルエタノールアミン (PE 16:0/18:2)、ホスファチジルセリン (PS 16:0/18:2)と、リノール酸、リノール酸メチル、コレステロールリノレート、トリアシルグリセロール (Fig. 4) を酵素 (大豆リポキシゲナーゼ-1)、自熱電球光照射、または UV 照射により酸化した (Fig. 5)。酸性触媒の存在下、低分子ビニルエーテルである 2-メトキシプロペンを反応させ、perketal 体を得た (Fig. 6)。極性が低下した perketal 体を逆相分取クロマトグラフィーで精製した。これを酸性条件下において perketal 部からアセトンを脱離させ、元のパーオキシサドを再生し、逆相分取クロマトグラフィーでリン脂質ハイドロパーオキシサドを精製し標品とした (Fig. 7)。以上の①酸化、②2-メトキシプロペンの付加と精製、③ハイドロパーオキシサドの再生と精製の 3 段階について反応条件の最適化を行い (Table 1-3)、各種脂質のハイドロパーオキシサドを高収率に得る条件を確立した。また、本法で得られた各種脂質ハイドロパーオキシサド標品は高純度 (>95%)であり、分析用の標品ばかりでなく、各種の細胞培養試験への適用も期待された。

第三章 脂質ハイドロパーオキシサドの LC-MS/MS を用いた高感度分子種分析法の開発

生体リン脂質ハイドロパーオキシサドを分子種ごとに高感度で測定できる方法の確立を目指し、LC-MS/MS の分析条件の最適化を行った。前章で調製したリン脂質ハイドロパーオキシサド標品を 100 nM のメタノール溶液として、Q3 部にリニアイオントラップ部を有するハイブリッド型の LC/MS/MS 装置である 4000 Q TRAP (Applied Biosystems 社製) に 5 μ L/min で連続注入し、ポジティブモードおよびネガティブモードにおいてプロダクトイオンの生成を調べた。例えば 1-Palmitoyl-2-Linoleoyl-PCOOH (PLPCOOH; 16:0/18:2) では、Fig. 8 のとおり多種類のプロダクトイオンが検出された。これを基に MRM (multiple reaction monitoring) の分析条件設定を行った。最も検出強度の強い 790.6/184.1 (amu)の検出強度を 100%とすると、脱水型の 772.6

(M-18) は 56.2%、OOH 部位の脱離型と思われる 756.6 (M-34) は 27.9%、125.0 は 27.2%、86.1 は 25.2%等となった。ネガティブイオンモードにおいては、最大でも 0.5% の強度しか得られなかった。しかし、実際に生体試料のリン脂質ハイドロパーオキシド測定を行ったところ、184.1 をプロダクトイオンに用いた MRM は選択性が低く、定量に適さなかった。そこで他の MRM ペアを用いることにし、特に脱水型の M-18、OOH 脱離型と思われる M-34 のプロダクトイオンを組み合わせた MRM 両方を用い、リン脂質ハイドロパーオキシドを選択的に検出できることがわかった。この傾向は全ての PCOOH に共通で見られた。次いで、島津製の HPLC を組み合わせ、メタノール:水 (100/12,v/v) に 5mM の酢酸アンモニウムを加えた移動相を用い、流速 0.6 mL/min で FIA (Flow injection analysis) で導入部条件の最適化を行った。カラムは対圧性能の高い Waters 社製の逆相系カラムが分離に適しており、特に Atlantis T3 (2.1 mm×100 mm, 粒径 3 μ m) が分析に適していた。これを用いて標品による検量線作成を行った (Fig. 9)。

併せて、ヒト血漿・血清からリン脂質ハイドロパーオキシドを効率よく抽出できる方法の確立を目指した。脂質抽出法としてよく用いられるクロロホルム・メタノールによる抽出法を用いて PLPCOOH の添加・回収試験を行ったところ、回収率は 80%以下となり、何らかのイオンサプレッサーの混入が避けられないことがわかった。そこで逆相系でありながら極性基も有する固相抽出カラムの Waters Oasis HLB を用い、リン脂質ハイドロパーオキシドを高収率に得る前処理法を確立した。また、内部標準物質として 1-Oleoyl-2-Mynstoyl-PCOOH (OMPCOOH) を添加することとした。

以上の方法により、ヒト血漿および血清から PCOOH を効率的に抽出し、LC-MS/MS で高感度に検出・定量することが出来た (Fig. 10)。一方で、PEOOH および PSOOH の血漿中の存在量は検出限界以下であることが示された。

第四章 健常者血漿および高コレステロール血症者血清分析への応用

前章で確立された分析法を用い、健常者血漿および高コレステロール血症者血清の PCOOH 分析を行った。測定対象の分子種は、生体内に多いと考えられる 12 種の PC (1-Palinitoyl-2-Oleoyl-PC, POPC; 1-Palinitoyl-2-linoleoyl-PC, PLPC; 1-Palinitoyl-2-linolenoyl-PC, PLnPC; 1-Palinitoyl-2-arachidonoyl-PC, PAPC; 1-Palinitoyl-2-eicosapentaenoyl-PC, PEPC; 1-Palinitoyl-2-docosahexaenoyl-PC, PDPC; 1-Stearoyl-2-Oleoyl-PC, SOPC; 1-Stearoyl-2-linoleoyl-PC, SLPC; 1-Stearoyl-2-linolenoyl-PC, SLnPC; 1-Stearoyl-2-arachidonoyl-PC, SAPC; 1-Stearoyl-2-eicosapentaenoyl-PC, SEPC; 1-Stearoyl-2-docosahexaenoyl-PC, SDPC) の各ハイドロパーオキシドとした。健常者のボランティア 10 名 (21-30 歳、 24.8 ± 2.7 、♂5、♀5) は前日の夕食に同じものを摂ってもらい、10 時間絶食の後に血液を採取した。これを EDTA で抗凝固処理した後に遠心分離により血漿を得た。健常者血漿に前述の前処理を行い、LC-MS/MS で分析したところ、リノレン酸型の PLnPCOOH、SLnPCOOH 以外の 10 分子種が検出され、総量は 44.0 nM だった (Fig.

11)。未酸化 PC に対する酸化率 (OOH への変化率) は、 $0.7 \times 10^{-3}\%$ から $16.9 \times 10^{-3}\%$ と幅広く、不飽和度が高い分子種で高い傾向を示した (Fig. 12)。また、LC - MS/MS での測定値は、ヒドロパーオキサイドを選択的に分析できる化学発光 - HPLC の分析値と正の相関を示した (Fig. 13)。一方で、高コレステロール血症者 20 名の血清を日本医科大学等から提供していただき、同様に分析を行った。同様にリノレン酸型の PLnPCOOH、SLnPCOOH 以外の 10 分子種が検出され、総量は 485 nM だった (Fig. 14)。また、同一の患者がスタチン系 HMG-CoA 還元酵素阻害剤であるリバロ (ピタバスタチンカルシウム) 等を 3 ヶ月間服用した後の血清も分析したところ、PCOOH が低下する傾向が見られた (Fig. 14)。また PCOOH の測定値は、総コレステロール量と正の弱い相関を示した (Fig. 15)。

第五章 総合考察

本研究では生体脂質過酸化脂質、特に脂質ヒドロパーオキサイドの LC-MS/MS を用いた超高感度網羅的分析法を確立することを目的とし、脂質ヒドロパーオキサイド標品の調製法、LC-MS/MS での分析条件最適化、および生体試料からのリン脂質ヒドロパーオキサイドの効率的な抽出法を確立した。その結果、健常者血漿および高コレステロール血症者血清から、PCOOH を分子種別に検出、定量することが可能になった。血液中ではグルタチオンペルオキシダーゼなどの還元酵素の働きが強く、酸化ストレスにより生じたヒドロパーオキサイドは即座にヒドロキシ型へ還元されるという説もある。しかし、前処理で添加した OMPCOOH は LC-MS/MS 分析の段階においても高い回収率 (80%以上) を示し、同様に他の PCOOH 分子種も検出されることから、生体内には常に PCOOH が存在することが証明された。高コレステロール血症においては、血漿と血清の違いはあるが、健常者よりも多くの PCOOH が検出された。これまで様々な疾病患者において PCOOH が高値であることが化学発光-HPLC の分析により示されてきたが、LC-MS/MS の分析においてもこれらを支持する結果を得られた。

近年、我々の研究室と日本医科大学の共同研究により、PCOOH の高純度標品を添加したヒト単球細胞 (THP-1) において接着性が著しく上昇することが明らかとなった。この結果は PCOOH が動脈硬化の発症と進展に影響することを示唆しており、PCOOH が単に疾病の症状悪化の産物ではないことを意味する。本研究は、過酸化脂質の疾病に対する作用機構の解明、および疾病による過酸化脂質蓄積の分析の両面に寄与し、様々な疾病の発症と進展の予防のための一助となることが期待される。

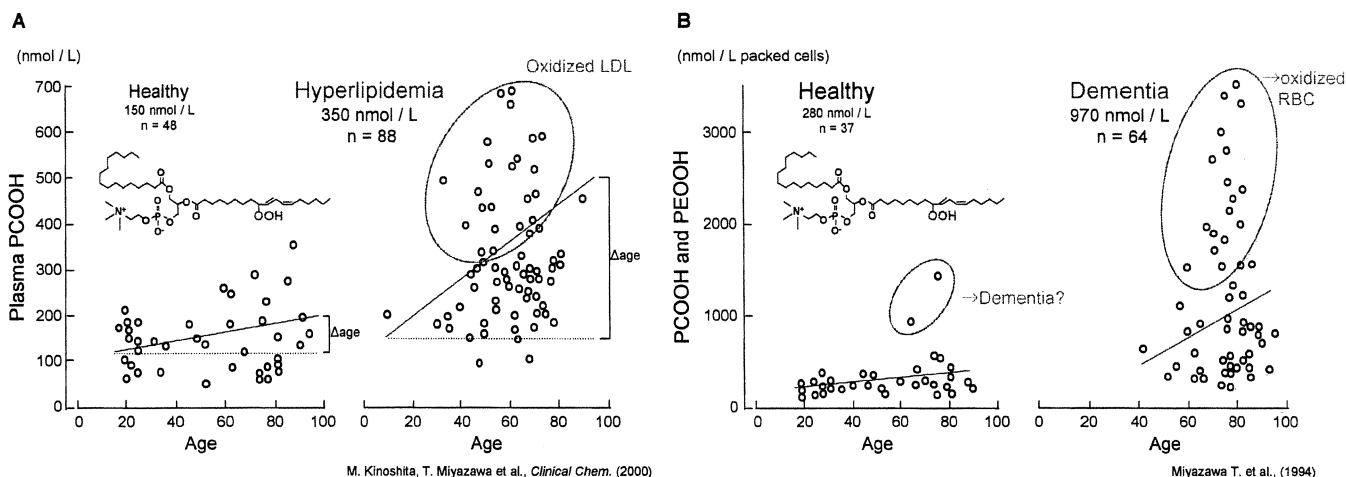


Fig. 1. Lipid extracts of plasma and red blood cell were analyzed by Chemiluminescence-HPLC. **A**, Comparison of plasma PCOOH from healthy and hyperlipidemic subjects. **B**, Comparison of PCOOH and PEOOH in red blood cell from healthy and hyperlipidemic subjects.

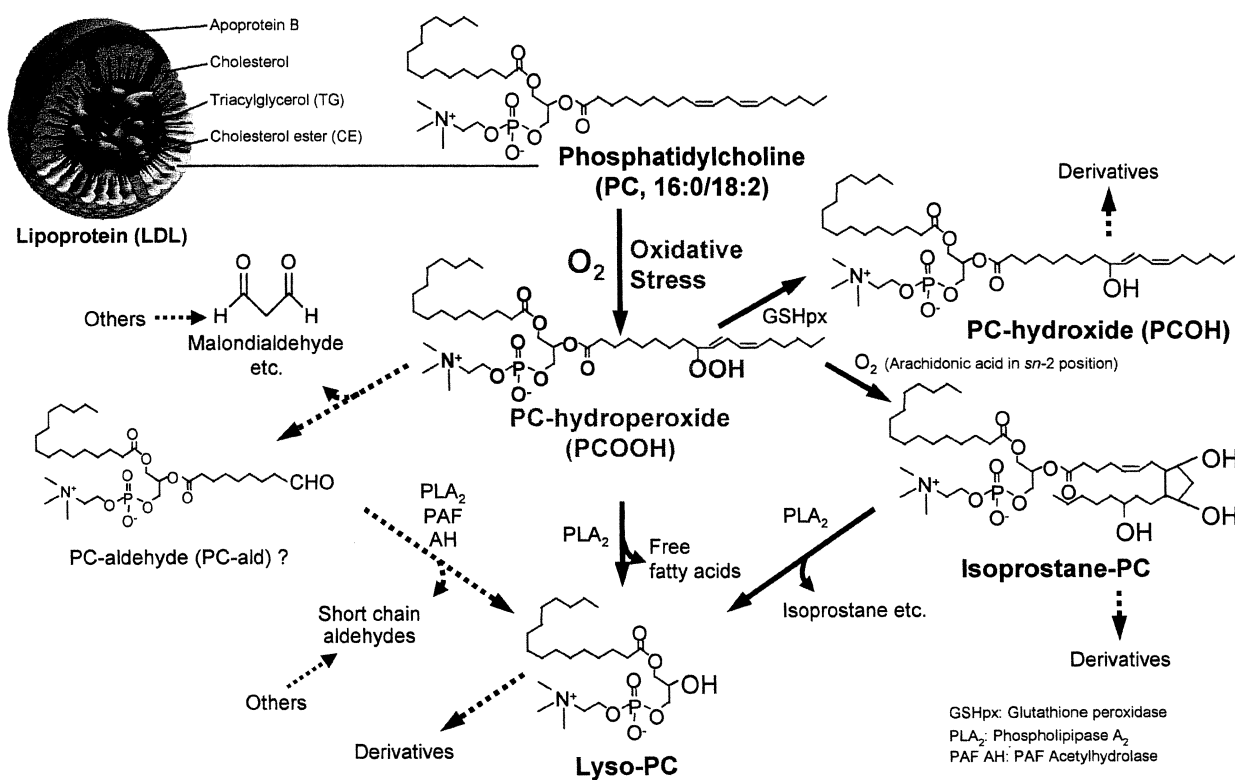


Fig. 2. Scheme of phosphatidylcholine peroxidation.

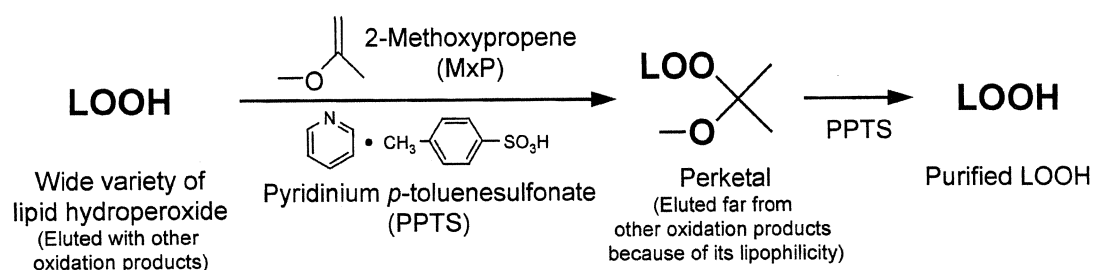


Fig. 3. Purification protocol of lipid hydroperoxides with 2-methoxypropene reaction.

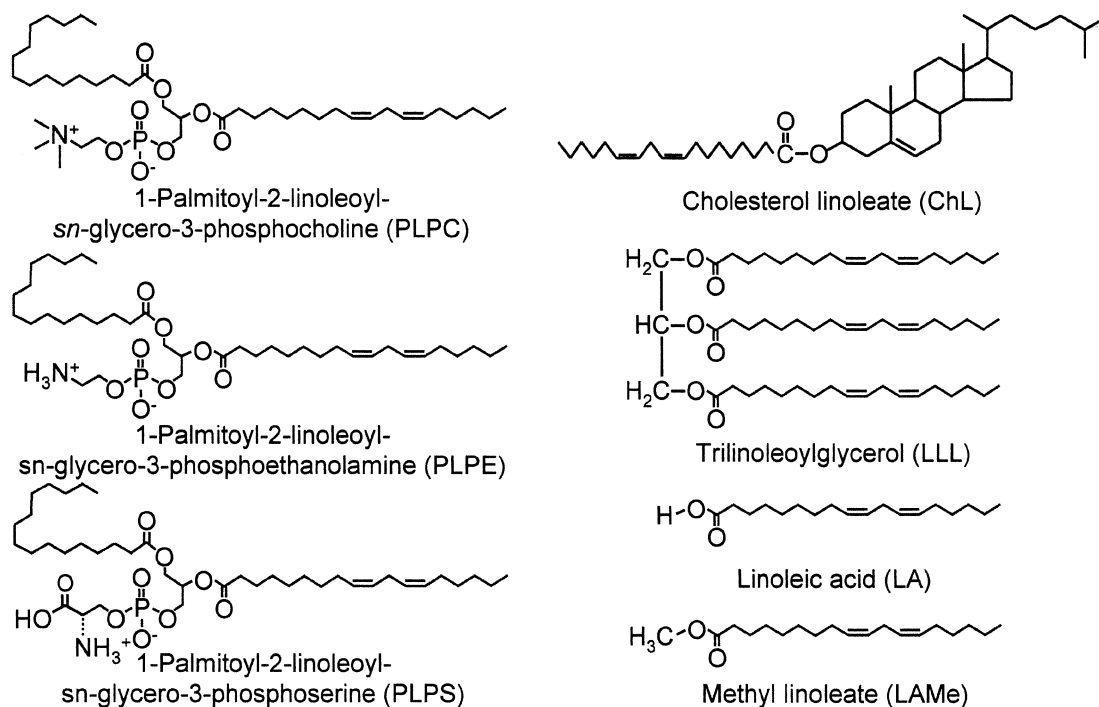


Fig. 4. Chemical structures of interested lipids.

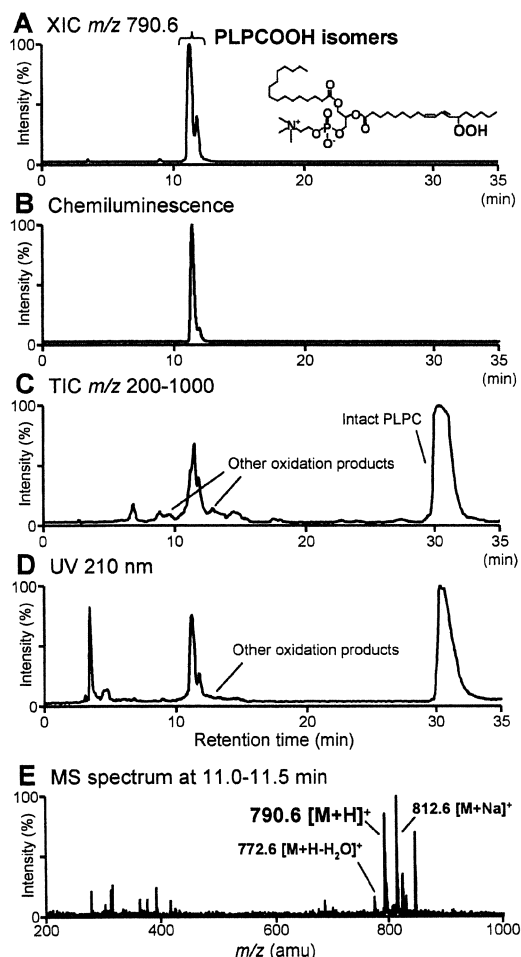


Fig. 5. Preparation of PLPCOOH. PLPC (100 mg/5 ml in methanol, containing 0.5 mg of rose bengal(RB)) was photo-oxidized for 8 h at 4 °C, and analyzed by LC-UV/CL/MS. **A**, Extracted ion chromatogram (XIC) of PLPCOOH (m/z 790.6 $[M+H]^+$) and its representative isomer (1-palmitoyl-2-(13-hydroperoxy-9Z,11E-octadecadienoyl)-*sn*-glycero-3-phosphocholine). **B**, CL chromatogram. **C**, Total ion chromatogram (TIC, m/z 200-1000). **D**, UV chromatogram (at 210 nm). And **E**, MS spectrum at 11.0-11.5 min.

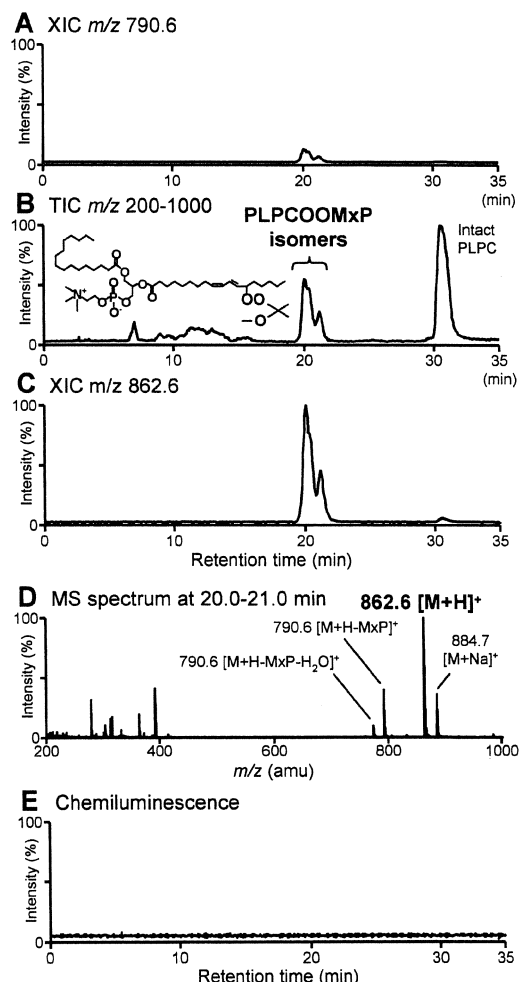


Fig. 6. Conversion of PLPCOOH to PLPCOOMxP (perketal). RB-catalyzed photo-oxidized PLPC sample (20 ml) was mixed with PPTS (5 mg/4 ml of dichloromethane) and 3 g (ca. 4 ml) of MxP. The sample was maintained for 3 h at 4 °C, and then analyzed by LC-UV/CL/MS. **A**, XIC of PLPCOOH (m/z 790.6 $[M+H]^+$). **B**, TIC (m/z 200-1000) and structure of PLPCOOMxP (representative MxP adduct of PLPCOOH isomer in Fig. 2). **C**, XIC of PLPCOOMxP (m/z 862.6 $[M+H]^+$). **D**, MS spectrum at 20.0-21.0 min. And **E**, CL chromatogram.

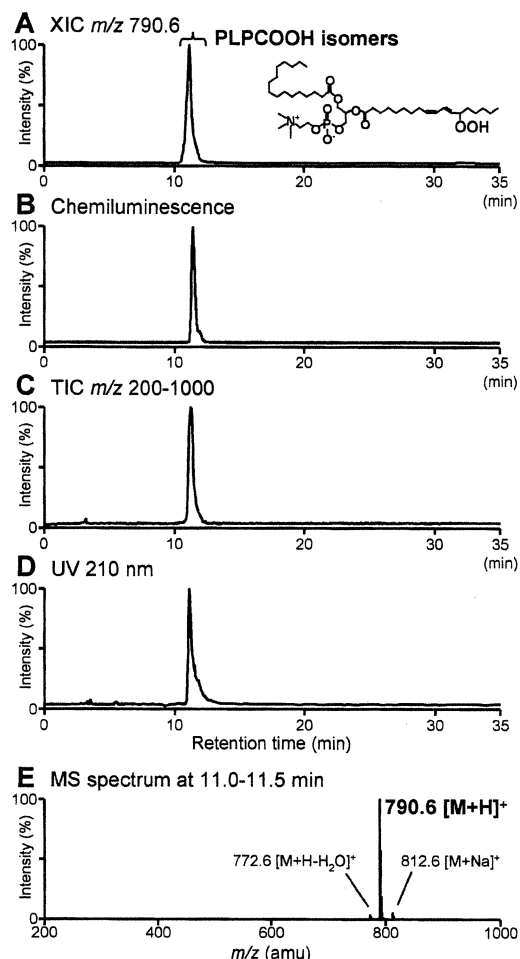


Fig. 7. Purity determination of PLPCOOH. PLPCOOH prepared by the final isolation in Fig. 6 was analyzed by LC-UV/CL/MS. **A**, XIC of PLPCOOH (m/z 790.6 $[M+H]^+$) and its representative isomer. **B**, CL chromatogram. **C**, TIC (m/z 200–1000). **D**, UV chromatogram (at 210 nm). And **E**, MS spectrum at 11.0–11.5 min.

Lipid	Oxidation procedure	Time	Temp	Yielded LOOH ^a
	mg	h	°C	mg
PLPC	100 RB-photo	8	4	PLPCOOH 30
	100 UV-photo	24	20	PLPCOOH 1.7
	100 LOX-1	12	40	PLPCOOH 96
PLPE	100 RB-photo	10	4	PLPEOOH 28
	100 UV-photo	24	20	PLPEOOH 1.4
	100 LOX-1	12	40	PLPEOOH 92
PLPS	100 RB-photo	10	4	PLPSOOH 30
	100 UV-photo	24	20	PLPSOOH 1.3
	100 LOX-1	12	40	PLPSOOH 94
ChL	100 RB-photo	8	4	ChLOOH 27
	100 UV-photo	24	20	ChLOOH 1.1
	100 LOX-1	24	40	ChLOOH 6.2
LLL	100 RB-photo	6	4	LLLOOH 31
	100 UV-photo	6	20	LLLOOH 35
	100 LOX-1	12	40	LLLOOH 9.4
LA	100 RB-photo	8	4	LAOOH 32
	100 UV-photo	12	20	LAOOH 35
	100 LOX-1	6	20	LAOOH 99
LAMe	100 RB-photo	8	4	LAMeOOH 34
	100 UV-photo	12	20	LAMeOOH 36
	100 LOX-1	8	20	LAMeOOH 97

Table 1. Optimal oxidation procedure to prepare LOOH.

^a LC retention times and MS profiles of hydroperoxides are as follows; PLPCOOH, 11.0 min, 790.6 $[M+H]^+$; PLPEOOH, 10.5 min, 748.5 $[M+H]^+$; PLPSOOH, 8.5 min, 790.4 $[M+H]^+$; ChLOOH, 26.5 min, 703.6 $[M+Na]^+$; LLLOOH, 23.0 min, 933.7 $[M+Na]^+$.

Sample	Added PPTS	Added MxP	Total reaction volume	Time	Temp	Yielded perketal ^c	Perketal after LC isolation
	mg/4 ml of dichloromethane	g (ca. ml)	ml	h	°C	mg	mg
PLPC (RB-photo ^a , 30 mg PLPCOOH ^b)	5	3 (4.0)	28	3	4	PLPCOOMxP 30	28
	2	1 (1.3)	25	2	4	PLPCOOMxP 1.6	1.5
	5	3 (4.0)	28	3	4	PLPCOOMxP 96	92
PLPE (RB-photo, 28 mg PLPEOOH)	5	3 (4.0)	28	3	4	PLPEOOMxP 27	22
	2	1 (1.3)	25	2	4	PLPEOOMxP 1.3	1.0
	5	3 (4.0)	28	3	4	PLPEOOMxP 90	86
PLPS (RB-photo, 30 mg PLPSOOH)	5	3 (4.0)	28	3	4	PLPSOOMxP 27	24
	2	1 (1.3)	25	2	4	PLPSOOMxP 1.2	1.0
	5	3 (4.0)	28	3	4	PLPSOOMxP 88	83
ChL (RB-photo, 27 mg ChLOOH)	5	5 (6.7)	31	3	20	ChLOOMxP 26	20
	2	2 (2.7)	27	3	20	ChLOOMxP 1.0	0.9
	2	2 (2.7)	27	3	20	ChLOOMxP 5.9	5.3
LLL (RB-photo, 31 mg LLLOOH)	10	5 (6.7)	31	3	20	LLLOOMxP 30	27
	10	5 (6.7)	31	3	20	LLLOOMxP 33	32
	5	3 (4.0)	28	3	20	LLLOOMxP 9.3	8.2
LA (RB-photo, 32 mg LAOOH)	2	1 (1.3)	25	1	4	LAOOMxP 30	24
	2	1 (1.3)	25	1	4	LAOOMxP 32	26
	5	2 (2.7)	27	1	4	LAOOMxP 95	85
LAMe (RB-photo, 34 mg LAMeOOH)	2	1 (1.3)	25	1	4	LAMeOOMxP 34	30
	2	1 (1.3)	25	1	4	LAMeOOMxP 36	33
	5	2 (2.7)	27	1	4	LAMeOOMxP 97	93

Table 2. Optimal condition of MxP reaction to prepare perketal.

^a Oxidation procedure. ^b LOOH concentrations in samples. ^c LC retention times and MS profiles of perketal are as follows; PLPCOOMxP, 20.0 min, 862.6 $[M+H]^+$; PLPEOOMxP, 18.5 min, 820.6 $[M+NH_4]^+$; PLPSOOMxP, 15.5 min, 862.5 $[M+H]^+$; ChLOOMxP, 51.5 min, 775.6 $[M+Na]^+$; LLLOOMxP, 45.0 min, 1005.8 $[M+Na]^+$; LAOOMxP, 49.5 min, 402.3 $[M+NH_4]^+$; LAMeOOMxP, 33.5 min, 416.3 $[M+NH_4]^+$.

Isolated perketal	Added PPTS	Total reaction volume	Time	Temp	Yielded LOOH ^b	LOOH after LC isolation	Purity of isolated LOOH
in 25 ml of chloroform/methanol (1:1)	mg/5 ml of chloroform/methanol	ml	h	°C	mg	mg	%
PLPCOOMxP (RB-photo ^a , 28 mg)	10	30	6	4	PLPCOOH 27	16	98
(UV-photo, 1.5 mg)	10	30	2	4	PLPCOOH 1.4	0.9	95
(LOX-1, 92 mg)	10	30	12	4	PLPCOOH 90	75	>99
PLPEOOMxP (RB-photo, 22 mg)	10	30	6	4	PLPEOOH 20	12	98
(UV-photo, 1.0 mg)	10	30	2	4	PLPEOOH 0.9	0.6	94
(LOX-1, 86 mg)	10	30	12	4	PLPEOOH 80	65	98
PLPSOOMxP (RB-photo, 24 mg)	10	30	6	4	PLPSOOH 22	14	98
(UV-photo, 1.0 mg)	10	30	2	4	PLPSOOH 0.9	0.6	93
(LOX-1, 83 mg)	10	30	12	4	PLPSOOH 78	60	98
ChLOOMxP (RB-photo, 20 mg)	10	30	6	20	ChLOOH 18	11	98
(UV-photo, 0.9 mg)	10	30	2	20	ChLOOH 0.8	0.5	95
(LOX-1, 5.3 mg)	10	30	2	20	ChLOOH 4.8	2.3	95
LLLOOMxP (RB-photo, 27 mg)	10	30	6	4	LLLOOH 26	19	95
(UV-photo, 32 mg)	10	30	6	4	LLLOOH 30	21	98
(LOX-1, 8.2 mg)	10	30	6	4	LLLOOH 7.6	5.0	98
LAOOMxP (RB-photo, 24 mg)	5	30	1	4	LAOOH 22	14	95
(UV-photo, 26 mg)	5	30	1	4	LAOOH 24	16	95
(LOX-1, 85 mg)	5	30	6	4	LAOOH 81	57	98
LAMeOOMxP (RB-photo, 30 mg)	5	30	1	4	LAMeOOH 28	19	95
(UV-photo, 33 mg)	5	30	1	4	LAMeOOH 31	20	97
(LOX-1, 93 mg)	5	30	6	4	LAMeOOH 90	78	>99

Table 3. Optimal condition of LOOH regeneration from perketal.

^a Oxidation procedure. ^b LC retention times and MS profiles of hydroperoxides are as follows; PLPCOOH, 11.0 min, 790.6 [M+H]⁺; PLPEOOH, 10.5 min, 748.5 [M+H]⁺; PLPSOOH, 8.5 min, 790.4 [M-H]⁻; ChLOOH, 26.5 min, 703.6 [M+Na]⁺; LLLOOH, 23.0 min, 933.7 [M+Na]⁺; LAOOH, 15.5 min, 330.3 [M+NH₄]⁺; LAMeOOH, 11.5 min, 349.3 [M+Na]⁺.

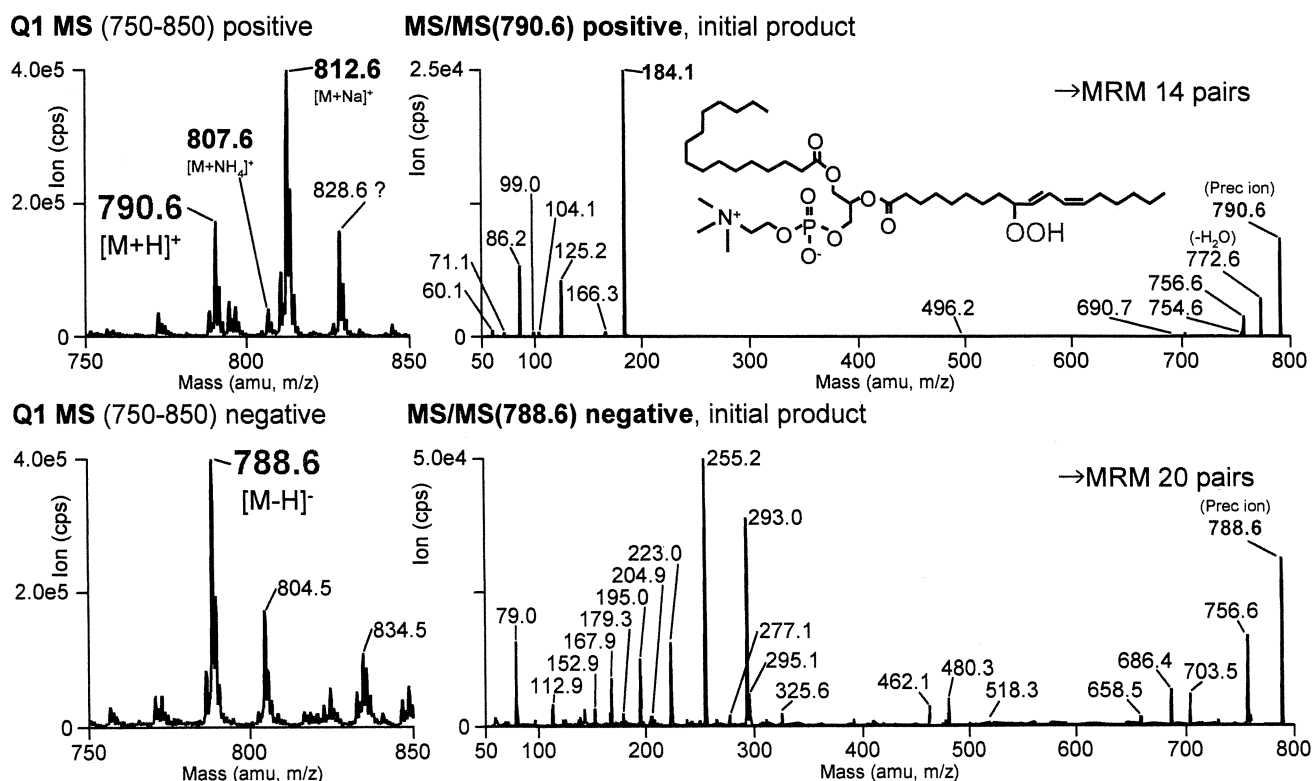
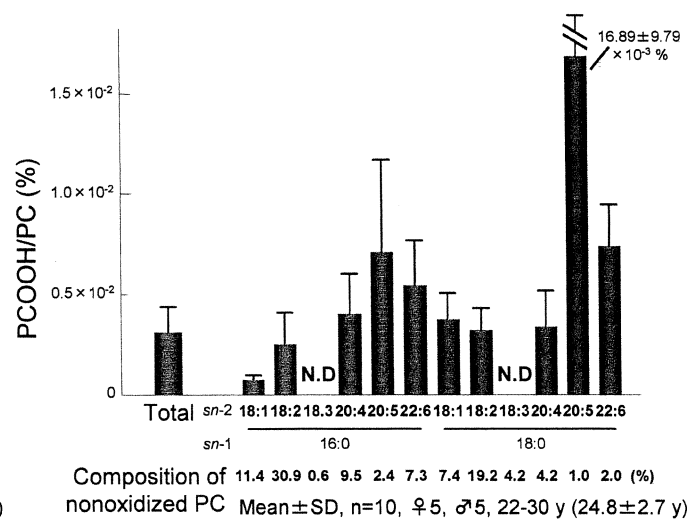
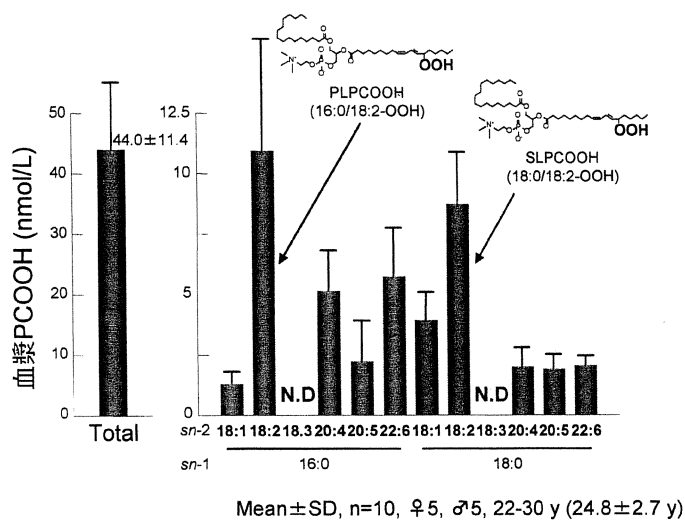
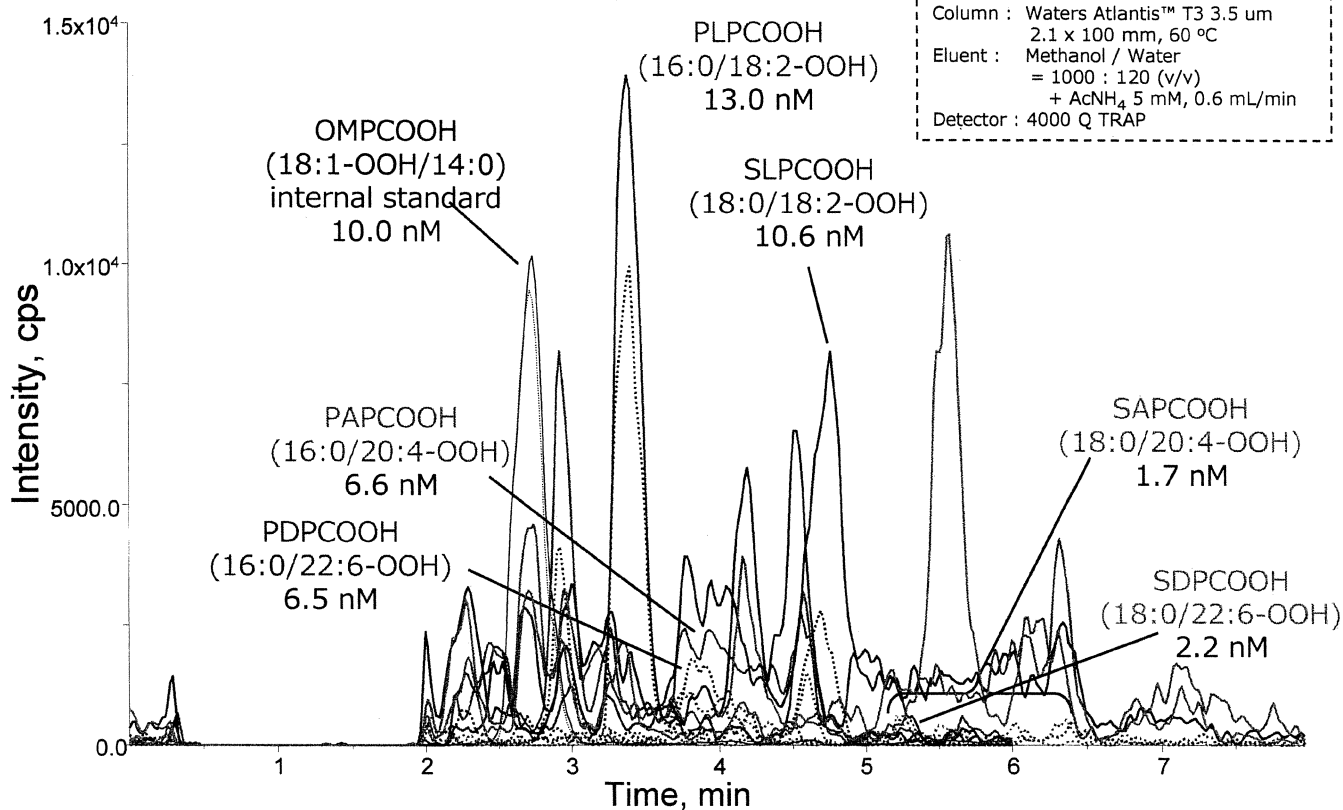
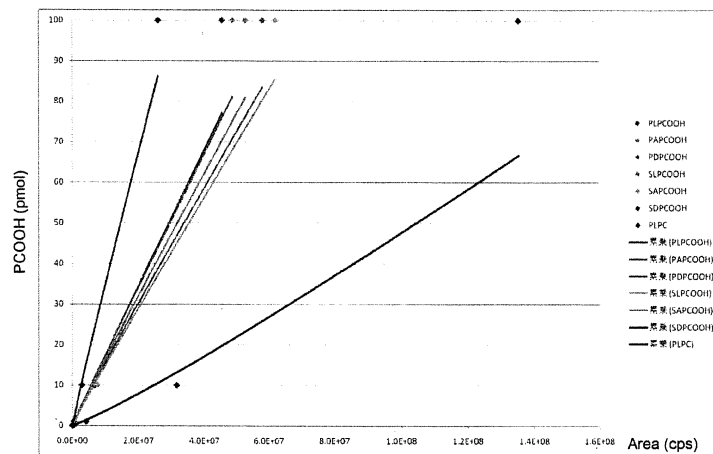


Fig. 8. Mass spectra of Q1 scan and product ion scan of PLPCOOH on positive and negative modes by infusion of 100 nM PLPCOOH (Methanol solution) to 4000 Q Trap tandem MS/MS.



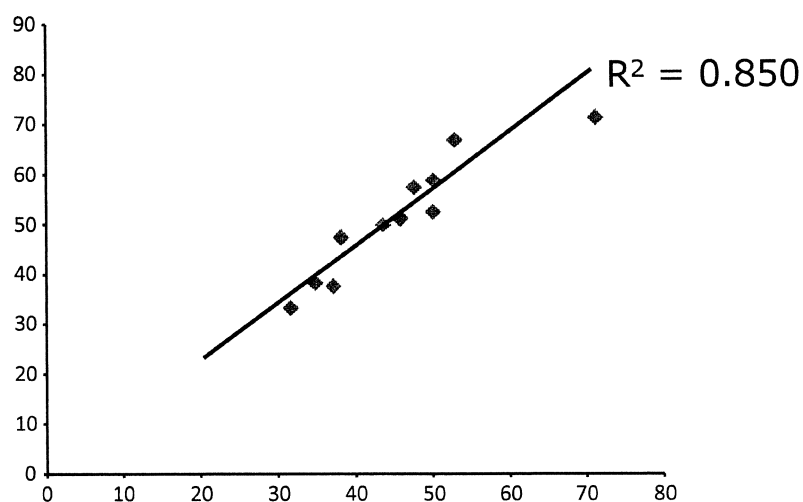


Fig. 13. Correlation between determined values of PCOOH in healthy plasma with LC-MS/MS and CL-HPLC.

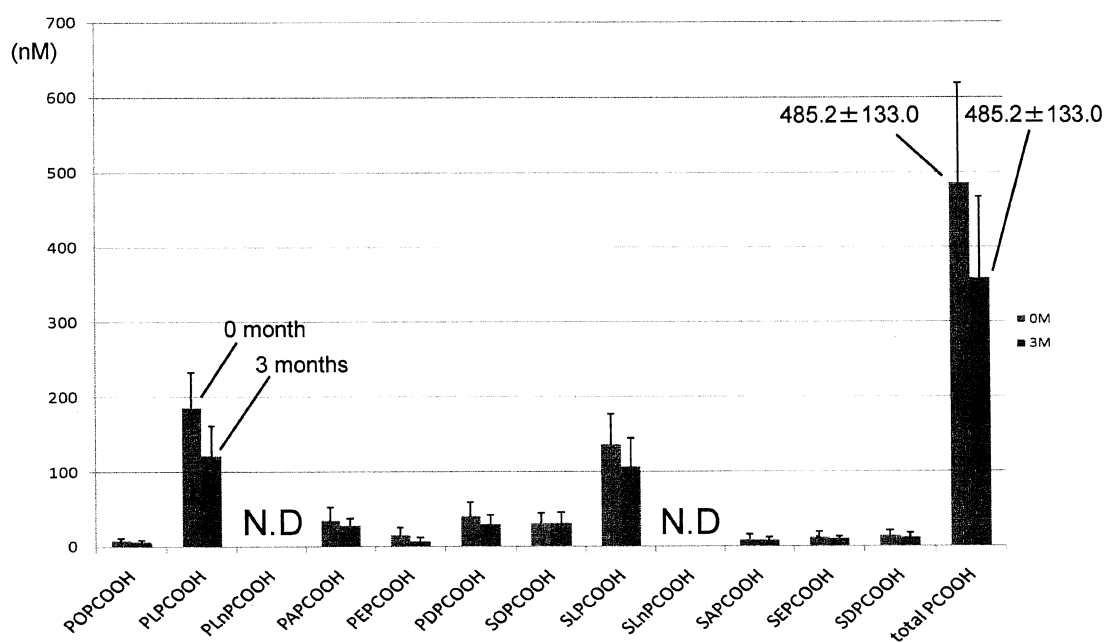


Fig. 14. Composition of PCOOH molecular species in serum of hypercholesterolemia patients with or without statin dose.

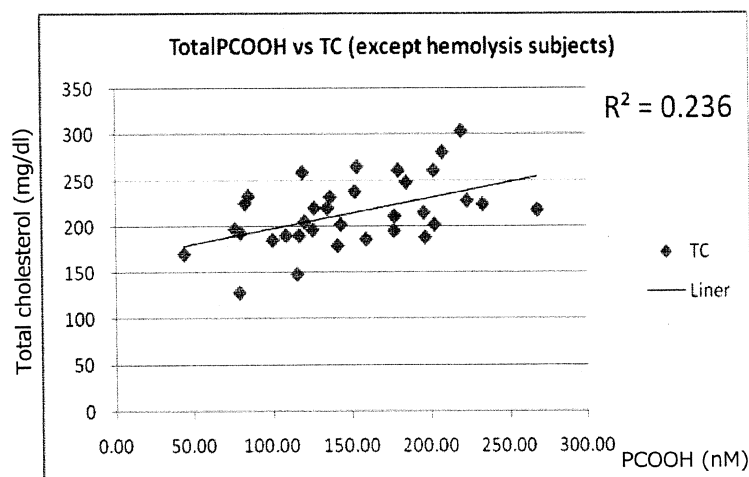


Fig. 15. Correlation of PCOOH and total cholesterol in hypercholesterolemic serum

論文審査結果要旨

生活習慣病の発症と進展に酸化ストレスで生じる過酸化脂質が関与する。高脂血症や糖尿病では病状の進行に伴い、リン脂質であるホスファチジルコリン(PC)の過酸化物(PC ハイドロパーオキサイド; PCOOH) が血液に増加する。従って、これらの過酸化脂質は酸化ストレスのバイオマーカーとしても期待されている。しかし、過去に生体 PCOOH の精密構造解析は成功していない。本研究では、高純度脂質ハイドロパーオキサイド標品の作製法を確立すると共に、LC-MS/MS を用いた高感度な分子種分析法を開発し、過酸化脂質と疾病の関係を明らかにしようとした。

第1章では、従来法では不可能だった高純度な脂質ハイドロパーオキサイドを簡便かつ高収率に調製する方法の開発にはじめて成功した。純度の低い過酸化脂質試料から、低分子ビニルエーテルである2-メトキシプロペンとの付加反応を用い、高純度な脂質ハイドロパーオキサイドを精製する方法を確立した。本法で得られた脂質ハイドロパーオキサイドは極めて高純度(>95%)であり、分析用の標品として使用できるだけでなく、細胞培養試験への応用も可能になった。第2章では、生体の PCOOH を分子種別に高感度測定できる方法を確立した。前章で調製した高純度 PCOOH を用い、MRM モードによる LC-MS/MS の分析条件を確立した。固相抽出と内部標準法を組み合わせ、ヒト血漿と血清から PCOOH を効率よく抽出できる方法を確立した。本研究により、ヒト血漿と血清の PCOOH を分子種別に検出定量できる分析法の確立にはじめて成功した。第3章では、健常者と高コレステロール血症者の血清 PCOOH を分析しその分子種を明らかにした。リノール酸型の PCOOH が最も多く、不安定さゆえに体内における存在が疑問視されていた EPA, DHA 型の PCOOH も検出に成功した。また、PCOOH 値が血中コレステロール値と正相関することを明らかにした。

本研究は超高純度の脂質ハイドロパーオキサイドを簡便で高収率に調製する方法を提供し、LC-MS/MS による PCOOH 分子種分析を可能にし、生体 PCOOH の脂肪酸別の分布を明らかにした。本成果は脂質酸化ストレスと疾病の関係を明示するものであり、社会への波及効果は極めて高い。よって審査員一同は、これを博士(農学)の学位を授与するに値するものと判定した。